

Posudek na diplomovou práci Bc. Marie Hlavničkové „Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* (Myxozoa) infikujících střeva a žlučový měchýř ryb na základě multigenové analýzy“

V předložené diplomové práci se Bc. Marie Hlavničková zabývá fylogenetickou pozicí několika myxosporidií rodu *Ceratomyxa* infikujících střeva nebo žlučový měchýř ryb. Jde o poměrně zajímavé téma, protože předchozí studie naznačily, že přinejmenším druh *C. shasta* není příbuzný ostatním druhům tohoto rodu a případné vyjasnění jeho fylogenetické pozice by mohlo mít výrazný vliv na chápání evoluce myxosporidií. Pro vyjasnění této problematiky autorka určila sekvence až tří genů z druhu *C. shasta* a několika dalších druhů myxosporidií. Z jejich analýz vyplývá, že *C. shasta* společně s dosud nepopsaným druhem morfologicky patřícím do rodu *Ceratomyxa* a parazitujícím ve střevě koljušky tvoří samostatnou fylogenetickou linii, která není příbuzná ostatním zástupcům rodu *Ceratomyxa*. Z objemu získaných dat je vidět, že autorka věnovala práci v laboratoři i u počítače dost času. To je však, bohužel, jediná světlá stránka předložené diplomové práce.

Úvod zahrnuje devět stran a popisuje morfologii, životní cykly, systematiku a fylogenezi skupiny Myxozoa, se zaměřením na rod *Ceratomyxa*. Celkově je spíše nepřehledný a již samotné řazení jeho částí nebylo zvoleno nejlépe – mezi kap. 1.4 Čeleď Ceratomyxidae a kap. 1.6. Taxonomie čeledi Ceratomyxidae je pro mne nepochopitelně vložena kap. 1.5. Fylogeneze myxozoi. Text ve formě seznamu některých druhů přeřazených z rodu *Leptotheca* do jiných rodů (str. 8) uvádějící původní i nové kombinace jmen (např. „*Ceratomyxa acanthopagri* původně *Leptotheca acanthopagri*, *Ceratomyxa agilis* původně *Leptotheca agilis*...“ považuji za zcela zbytečný. Navíc se v úvodu vyskytuje řada nejasných, zavádějících nebo vyloženě chybných tvrzení, které znesnadňují jeho pochopení (to se vlastně týká celé práce). Několik jich zde uvádím:

„Mitochondrie mají plochý, tubulární nebo diskovitý tvar“ (str. 1, pravděpodobně byly míněny mitochondriální krysty).

„Dvě hlavní větve myxozoi, Myxosporea a Malacosporea, jsou stanoveny na základě životního prostředí jejich hostitelů – mořském a sladkovodním prostředí (str. 3, obě třídy mají sladkovodní zástupce).

„Na základě trinukleotidového opakování ATC byly získány 4 ITS-1 genotypy: 0, I, II, III. (str. 5).

„... a nálezy parazita u většiny obratlovců poskytovaly jen velmi málo indicií k objasnění původu myxozoi a jejich zařazení“ (str. 5, nechápu, jak by také mohly).

„... jehož fylogenetická pozice představuje samostatnou linii“ (str. 5).

„... zařazení typového druhu *L. agilis* (Thélohan, 1892) je velmi nejednoznačné“ (str. 7, právě zařazení typového druhu je vždy jednoznačné). „[*C. shasta*]

„metoda Bayesian posterior probabilities“ (str. 9).

Kapitola Materiál (2 strany) je zpracována přehledně, pouze bych uvítal, aby lokality sběru („geografická lokalizace“ v tab. 1) byly lépe charakterizovány.

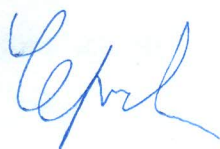
Kapitola Metodika zahrnuje osm stran. Vyplývá z ní, že autorka během svého magisterského projektu používala základní metody molekulární biologie (izolace DNA, PCR, klonování, elektroforéza) a molekulární fylogenetiky. Kapitola jako celek je nevyvážená. Zatímco některé metody, např. PCR a elektroforéza, jsou popsány velmi podrobně, popis jiných, např. klonování a molekulární fylogenetiky, je nedostatečný nebo dokonce chybný. Pokud by čtenář opakoval transformaci kompetentních buněk podle popisu v diplomové práci, výsledek by byl bílý povlak na celé Petriho misce. Do média (nespecifikovaná „bakteriální půda“) totiž nebylo přidáno antibiotikum. I pokud by tam bylo přidáno, narostly by pouze bílé kolonie, protože do média nebyl přidán IPTG a X-gal (jehož koncentrace ani není uvedena) by nebyl metabolizován. V kapitole 4.7. je k bakteriím přidáno 12 μ l ampicilinu, aniž by byla uvedena koncentrace jeho roztoku. Ke kapitole Fylogenetická analýza mám řadu výhrad. „Méně striktní parametry“ u programu Gblocks není dostatečný popis. Podobně u heuristického hledání u metody MP chybí např. jakým způsobem byly topologie swapovány a kolik opakování bylo použito pro nalezení topologie. Pokud byl MCMCC řetězec spouštěn po dobu 10^6 generací a sampling byl každou stou generací, znamená to, že při hodnotě burn-in 10 000 byly odstraněny všechny stromy. Z čeho byly tedy odhadovány posteriorní pravděpodobnosti? Za největší nedostatek kapitoly Metodika ovšem považuji absenci jakékoli informace o tom, jak byl analyzován konkatenát více genů, vzhledem k tomu, že různé způsoby analýzy konkatenátů mohou vést k výrazně odlišným výsledkům.

Kapitola Výsledky (9 stran) obsahuje zejména pět fylogenetických stromů a popis jejich morfologie. Svou kvalitou se Výsledky příliš neliší od ostatních částí. Pouze stromy na obr. 3 a 6 jsou graficky v pořádku, ostatní jsou vertikálně roztáhlé (obr. 2 a 4) nebo je v nich použito zbytečně malé písmo (obr. 4 a 5), a jsou nepřehledné. Nedostatkem je i absence informace o metodě, kterou bylo ten který strom zkonstruován. Protože se jedná o nezakořeněné fylogenetické stromy, uvedené podpory se nevztahují k uzlům, jak je uvedeno, ale k větvím. Proto překvapí, že u větve „nejvíce nalevo“ jsou nejen vždy uvedena podpora dvakrát, ale že tyto podpory stejné větve od sebe liší (např. 100/100/1 vs. 100/-/- v obr. 3). Popis topologií stromu je v pořádku, snad až na opakovaný výraz „metoda MrBay“. Zde na mnoha místech nesouhlasím s interpretací hodnot statistické podpory jednotlivých větví, např. hodnoty 70/-/0.61 nepovažuji za „střední bootstrapovou podporu“ ale za zanedbatelnou podporu.

Diskuze (4 strany) je psána o poznání lepším stylem. I když i zde lze najít několik nepřesných vyjádření nebo protimluvů, považuji ji za nejzdařilejší část práce.

Celkově vzbuzuje předložená magisterská práce Bc. Marie Hlavničkové dojem příliš rychle sepsaného textu, který po sobě autorka nestihla zkontrolovat. Některé části navíc vyvolávají pochybnosti, zda autorka pochopila všechny použité metody. I tak se však domnívám, že práce, i když s výhradami, splňuje nároky kladené na diplomové práce a doporučuji ji k obhajobě.

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Katedra zoologie PřF UK
Viničná 7
128 44 Praha 2



Oponentský posudek na magisterskou práci Marie Hlavničkové

Fylogenetické vztahy druhů rodu *Ceratomyxa* (Myxozoa) infikující střeva a žlučový měchýř ryb na základě multigenové analýzy

Marie Hlavničková se v předkládané magisterské práci zabývá studiem molekulárně fylogenetických vztahů parazitických myxozoi rodu *Ceratomyxa* a úzce tak navazuje na výsledky své bakalářské práce, vypracované stejně jako v případě současné práce v Laboratoři rybí protistologie Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. Magisterská práce si klade za cíl rozšířit současný dataset o sekvence dalších, u myxozoi do současné doby jen do velmi omezené míry využívaných genů, a na jejich základě objasnit nejasné příbuzenské vztahy nejen v rámci rodu *Ceratomyxa*, ale zároveň také fylogenetickou pozici druhu *Ceratomyxa shasta*, který narozdíl od zbylých zástupců rodu neparazituje ve žlučovém měchýři mořských ryb, ale ve střevní stěně lososovitých ryb. Přesná fylogenetická pozice tohoto taxonu zůstává v době molekulární fylogenetiky nejasná, stejně tak jako vzájemné vztahy jednotlivých, minimálně pěti monofyletických skupin, které dle současných znalostí tvoří jednu ze dvou základních linií myxosporeí, tj. myxosporeí parazitující mořské ryby.

Hned na úvod musím bohužel zmínit, že předkládaná práce jako celek na čtenáře působí dojmem, že byla sepsána ve velkém spěchu a nedala autorce příliš práce. To se neodráží ani tak v množství přítomných překlepů – kterých je relativně málo, či v chybách v citovaných referencích – ty jsou zde bezchybné. Výhrady směřují především k celkové formě, formulaci a množství informace, kterou se nám text celé práce snaží sdělit. Celý text by mohl být o něco lépe členěn, informace podávány v logické posloupnosti, fundovaně a uceleně, jak by člověk od magisterské práce, která navíc navazuje na práci bakalářskou očekával. Celý text také obsahuje na můj vkus příliš mnoho informace prostých vět, které občas nejsou ani dále rozvíjeny. Jen pro ilustraci uvádím některé z nejnázornějších: „Mitochondrie mají plochý, tubulární nebo diskovitý tvar.“ (str. 1) či „Sladkovodní linie se dále fylogeneticky dělí do skupin.“ (str. 6). Text je také členěn do obrovského množství odstavců. Jsem toho názoru, že takovéto členění je nadměrné, a to zejména v momentě, kdy nemalé množství odstavců sestává pouze z jedné věty.

Úvod práce, jehož cílem by mělo být seznámit témata neznalého čtenáře s problematikou, ve mně zanechává spíše více otázek než že by mě seznámil s fakty, která jsou v současné době známá. Čtenář se v úvodu vůbec nedozví, jaké molekulárně fylogenetické práce, za použití jakých konkrétní metodických přístupů a s jakými výsledky se do současné doby studovaného tématu dotkly, v jakých aspektech se shodovaly a v čem se navzájem lišily.

Kapitole 1.2. Životní cyklus by velmi prospěl názorný obrázek. Chápu, že tato kapitola není pro tuto práci kritická, nicméně pokud je již jednou součástí práce, měla by být co nejspíše pochopitelná. O to více by však obrázek prospěl kapitole 1.5. Fylogeneze myxozoi, která je pro úvod do studované tematiky naopak jednou z klíčových.

str. 3 – pokud autorka v textu používá jakékoliv zkratky, měla by, pokud není součástí práce seznam zkratk, na prvním místě výskytu zkratky v textu uvést také celý její název.

Formulace hojně užívané v textu úvodu, výsledků i diskuze zanechávají ve čtenáři silný dojem, že autorka nedisponuje hlubší znalostí ve fylogenetice užívané terminologie. Je opravdu s podivem, že jsem v celé práci nezaznamenal jediné užití některých základních termínů (např. termínu monofyletický), namísto toho mnoho částí textu přetéká kostrbatými výrazy jako např. „klastrování v kladu“ atp.

Kapitola 4. Metodika seznamuje čtenáře s použitou metodikou možná až do přílišných detailů. Vzhledem k tomu, že se jedná o zcela standardně užívanou metodiku, bylo by vhodnější kapitolu zkrátit, alespoň trochu zhutnit a nepodstatné věci vypustit.

V kapitole 5. Výsledky a následně v kapitole 6. Diskuze pak autorka ne zcela obratně slovy seznamuje čtenáře s výsledky všech jednotlivých fylogenetických analýz, které v rámci vypracování magisterské práce udělala, a které jsou vyobrazeny prostřednictvím fylogramů na obr. 2–6. Opět se domnívám, že není nezbytně nutné slovy opisovat vše, co lze z každého z výsledných fylogenetických stromů vyčíst, ale spíše se soustředit na to, co je jednotlivým analýzám společné, v čem konkrétním se liší, případně jaké nové výsledky přinášejí. V kapitole Diskuze pak tyto věci více diskutovat se závěry předchozích studií. Zdržel bych se také užívání výrazů „střední hodnoty bootstrapu“, že se něco „větví mimo skupinu“ (str. 30) a tvrzení, že *Ceratomyxa arcuata* (vzorek 302) tvoří „samostatný taxon“ na obr. 3, 4 a 6. Nepředstavuje snad *Ceratomyxa arcuata* na těchto fylogramech „sesterský taxon“ některým dalším zástupcům rodu *Ceratomyxa*, stejně tak jak je označován na zbývajících fylogramech na obr. 2 a 5?

str. 25 – nesouhlasím s tvrzením, že „Fylogenetická analýza genu pro elongační faktor 2 (Obr. 5) potvrdila pozici *Ceratomyxa shasta* vně skupiny mořských myxozoi“. To, že na tomto obrázku *Ceratomyxa shasta* tvoří sesterský taxon všem ostatním skupinám mořských myxozoi přece současně neznamená, že ho z tohoto taxonu musíme vyloučit. To by bylo možné v případě, že by byl blíže příbuzný některé ze sladkovodních linií, což ale nelze na základě této analýzy posoudit. Je tomu tak?

Zajímalo by mě, proč nebylo k analýze získaných sekvencí použita také analýza aminokyselinových sekvencí genu kódujícího elongační faktor 2? Zároveň také postrádám jakoukoliv analýzu možné saturace fylogenetického signálu v analyzovaných sekvencích, zejména pak saturaci jednotlivých kodónových pozic v protein-kódující sekvenci elongačního faktoru 2. Je možné toto doplnit alespoň do prezentace pro obhajobu?

Posledním dotazem, který mě v průběhu četby práce napadl, je pak čistě zvědavá otázka, je-li možné odhadnout, u zhruba jak velké části známých druhů myxosporéi je rovněž popsána aktinosporová fáze jejich životního cyklu?

Na závěr bych si dovilil vyzdvihnout přínos této práce, kterým bezesporu jsou data zde nově získaná a analyzovaná. Cesta k získání nových sekvencí jak genu kódujícího velkou

podjednotku nukleární ribozomální RNA, tak elongačního faktoru 2 určitě nebyla lehká. Navíc možný přínos těchto sekvencí k lepšímu porozumění evolučních vztahů zástupců rodu *Ceratomyxa* byl velmi nejistý. Přesto se autorka ve své magisterské práci s vytyčenými cíli vypořádala velmi dobře. Přes výše zmíněné výhrady k psané formě magisterské práce proto konstatuji, že předkládaná magisterská práce Marie Hlavničkové splňuje požadavky kladené na magisterské práce na Katedře medicínské biologie, Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a doporučuji ji k obhajobě. Práci navrhuji hodnotit v rozmezí velmi dobře – dobře, v závislosti na kvalitě obhajoby.

V Českých Budějovicích, dne 14. ledna 2013



RNDr. Jan Brabec, Ph.D.